

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И ГЕНЕТИКИ

На правах рукописи

САРАНДЖИ Виджайя Кетан

КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ, ПРОТОПЛАСТОВ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ
ГОЛУБИНОГО ГОРОХА [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.].

Специальность 03.00.12 - Физиология растений
03.00.15 - Генетика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев - 1992

№ 26. 738

Работа выполнена в отделе цитофизиологии и клеточной инженерии
Института клеточной биологии и генетической инженерии АН Укра-
ины.

ЛІНБ України ім.В.Стефаніка



00825658 (Y)

руководитель - академик АН Украины, доктор биологичес-
ких наук, профессор ГЛЕБА Ю. Ю.

ные оппоненты - Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
Левенко В. А.

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник,
Сарнацкая В. В.

Ведущая организация - Институт молекулярной биологии и
генетики, АН Украины

Защита диссертации состоится ¹⁰ 17 декабря 1992г. в часов
на заседании специализированного совета Д. 016. 57. 01 по защите
диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при Инс-
титуте Физиологии Растений и Генетики АН Украины.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке

Автореферат разослан "4" декабря 1992.

Ученый секретарь
специализированного совета
кандидат биологических наук

ЛІНБ ім. В. Стефаніка
АН України
В. А. Труханов.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: За прошедшие 10 с небольшим лет генетическая и клеточная инженерия растений достигли впечатляющих успехов в расшифровке механизмов организации, функционирования и регуляции растительного генома, а также в конструировании новых форм растений, обладающих целым рядом хозяйственно-ценных признаков. Развитие этого направления вывело науку на новые ступени в познании живой природы. Более того, применение методов биотехнологии растений уже в настоящее время существенно изменяет и ускоряет селекционный процесс по выведению высокоурожайных и устойчивых к неблагоприятным факторам среды сортов сельскохозяйственных растений.

В то же время подавляющее большинство экспериментов по клеточной и генетической инженерии растений проведены на видах из семейств пасленовых и, в меньшей степени, крестоцветных. Значительно хуже изучены в этом отношении важные для сельскохозяйственного производства виды из семейств алаковых и бобовых.

Во многом это положение сложилось из-за проблем, связанных с культивированием этих видов растений в условиях *in vitro*, регенерации растений из неорганизованных клеточных линий (каллуса), оптимизации условий культивирования протопластов.

Попытки решения этих задач, опубликованные в работах, вышедших к моменту начала наших исследований (1989 г.), имели ограниченный успех. Только у таких видов как люцерна или клевер белый из семейства бобовых были получены положительные результаты по культивированию протопластов и регенерации растений, позволяющие более оптимистично смотреть на возможность получения трансгенных растений и соматических гибридов у этих видов. Хотя о регенерации растений из протопластов гороха сообщалось, процент регенерации полных растений был очень низким и воспроизводимость результатов вызвала сомнение.

Цели и задачи исследования: В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы была разработка приемов и методов генетической и клеточной инженерии для голубиногороха (*Cajanus cajan*, семейство Fabaceae), и получение при помощи этих способов трансгенных клеточных линий и растений, а также соматических гибридов. Кроме того, предполагалось изучить возможность использования мутантов "shooty" *Agrobacterium tumefaciens* для улучшения регенерационного потенциала *Cajanus cajan*.

Согласно поставленной цели и задачи экспериментальной работы входило:

1. Разработать приемы и методы выделения и культивирования протопластов у голубинового гороха (*Sajalis sajan* (L.) Millsp.).
2. Выяснить возможность регенерации растений из протопластов и стандартизации системы: растение - протопласты - растение.
3. Установить возможность регенерации растений из каллусов, полученных из разных частей растения.
4. Определить возможность инфицирования голубинового гороха *A. tumefaciens* для прямого переноса гена.
5. Определить возможность переноса растительных селективных генов в голубинный горох при помощи *Agrobacterium tumefaciens*.
6. Выяснить целесообразность использования мутантов *shooty* *A. tumefaciens* для индуцирования регенерации *in vitro* при культивировании клеток и тканей голубинового гороха.
7. Разработать приемы генетической трансформации путем электропорации протопластов в присутствии плазмидных ДНК, несущих маркерные эукариотические гены.
8. Разработать приемы соматической гибридизации с использованием инактивации одного из партнеров гамма-облучением.
9. Выявить возможность переноса селективных маркерных признаков и развития растений с маркерными чертами.
10. Определить возможность передачи голубиному гороху морфогенетической способности от диких видов растений путем слияния облученных протопластов донора с протопластами реципиента.
11. Доказать трансгенную природу отобранных растений при помощи ДНК-ДНК гибридизации по Саузерну и определения активности нeомицинфосфотрансферазы.

Научная новизна: Были стандартизованы методы регенерации растений *in vitro* и идентифицированы эксплантаты, способные к регенерации растения. Нами получены также растения-регенеранты.

Впервые разработаны и стандартизованы экспериментальные протоколы для изоляции протопластов мезофилла и каллуса и получения каллуса из изолированных протопластов.

Впервые обнаружена совместимость хозяин-патоген при передаче плазмидной ДНК между голубиным горохом и *A. tumefaciens*.

Впервые показано, что интеграция генов T-ДНК мутанта "shooty" *A. tumefaciens* в геном растений голубинового гороха, не обладающих признаком регенерационной способности, приводит к появлению такого признака у трансгенных линий.

Впервые получены канамциллинрезистентные клеточные линии и рас-

тения-регенеранты после введения в голубиный горох гена с помощью *Agrobacterium*.

Первые мезофильные протопласты голубиноного гороха были трансформированы плазмидной ДНК посредством электропорации и показана интеграция селективного признака в трансгенные клеточные линии.

Первые отработана методика межсемейственного асимметричного слияния между облучёнными маркерными (канамицинрезистентными) протопластами *M. tabacum* и протопластами *S. sajan*. Продукты слияния делились и образовывали клеточные линии, которые были отсеleктированы на среде, содержащей канамицин.

Практическая ценность: Разработанный нами способ выделения и культивирования протопластов может быть использован в клеточной и генетической инженерии растений для получения ценного исходного селекционного материала у голубиноного гороха.

Открытие совместимости *Agrobacterium tumefaciens* и клеток или тканей голубиноного гороха при инфицировании открывает возможность непрямо́й передачи гена этому сельскохозяйственному растению, имеющему большое практическое значение. Нам удалось получить трансгенные канамицинрезистентные растения, представляющие интерес для дальнейших исследований.

Стандартизация экспериментальных протоколов и идентификация эксплантатов, способных *in vitro* регенерировать растения, делают реальным их различное практическое применение. Использование этих эксплантатов для индукции соматональной изменчивости и переноса генов с помощью *Agrobacterium* посредством совместного культивирования имеет большое практическое значение в программе улучшения полезных качеств голубиноного гороха.

Попытка асимметричной парасексуальной гибридизации протопластов голубиноного гороха с протопластами *M. tabacum* оказалась успешной. При дальнейшем культивировании продуктов слияния были получены клеточные линии. Это имеет большое прикладное значение в отдаленной гибридизации голубиноного гороха с родственными видами, имеющими желаемые агрономические признаки.

Апробация работы: Материалы диссертационной работы были доложены на: 1. XI International Symposium, Embryology and Seed Reproduction. July 3-7, 1990, Leningrad, USSR.; 2. International protoplast symposium, June 18-20, 1991, Uppsala, Sweden; 3. International Symposium on Plant Biotechnology and Its contribution to the Improvement. Geneva, Switzerland, April 19-20, 1991.; 4. First symposium 'Trends in Plant Biotechnology', November 20-22, 1991 г. Puschino, Moscow, USSR.

Публикации: Основные результаты диссертации отражены в восьми печатных работах, список которых приводится в конце автореферата.

Структура и объем работы: Диссертация состоит из "Введения", глав "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты исследований", "Обсуждение полученных результатов", "Выводов" и "Списка литературы", включающего 390 библиографических ссылок. Работа изложена на 160 страницах машинописи, содержит 5 таблиц и 8 рисунков, включающих 45 фотографий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие сорта и линии видов из семейства бобовых. Семена голубинового гороха, *Cajanus cajan* (L.) Millsp., сорт ICPL-87 (arhar), RAY-1 (Raygada local) и KAN-1 (kandula), получены из (Regional Pulse Research Station, Nayagarh, Orissa, India). Трансгенные растения *Nicotiana tabacum* L., устойчивые к канамицинусульфату любезно предоставлены к.б.н. Зубко Е.И., Институт клеточной биологии и генетической инженерии АН Украины.

У всех вышеперечисленных видов после стерилизации семян 2% раствором Аجاتина (Slovakofarma, Czechoslovakia) в течение 15-20 мин. и трехкратной отмывки стерильной дистиллированной водой были получены асептические растения. Растения выращивали на безгормональной питательной среде MS (Murashige & Skoog, 1962) в культуральной комнате (18-часовой фотопериод, освещение 2-3 тыс. люкс, температура $25 \pm 2^{\circ}$ C).

Эксплантаты и культура каллуса

Семядоли, семядольные сегменты, гипокотиль, листья и стебель были взяты из проростков различного возраста и высажены на агаризованную среду MS с различными концентрациями фитогормонов (БАП, кинетин, аденинсульфат, зеатин, ГК₃, 2,4-Д и НУК), для того чтобы исследовать возможность каллусогенеза и регенерационную способность.

Фрагменты семядолей и декапитуированных проростков культивировали на твердой среде MS с добавлением 1,5 мг/л или 1,0 мг/л БАП, чтобы индуцировать органогенез и регенерацию растений.

Различные эксплантаты, такие как семядоли, листья, эпикотиль и стебель дедифференцировали в каллус на агаризованной среде MS и B5 (Gamborg et al., 1968). Каллусы поддерживали на питательной среде, содержащей 0,5 мг/л БАП, 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л НУК, и в дальнейшем использовали для выделения протопластов.

Выделение и культивирование протопластов.

Листья асептически выращенных растений или горошины нарезаали полосками размером 1-2 см и помещали в ферментативную смесь следующего состава: 2,0% Onozuka R10 (SERVA), 0,8% Macerozyme R10 (SERVA), 0,8% Pectinase (KOCCH-LIGHT), 0,8% Driselase (SIGMA), 0,4% Cellulysin (Calbiochem). В качестве осмотика использовали 0,4 М маннитол с добавлением 0,1% MES (Morpholinoethane sulfonic acid). Инкубация растительных тканей в указанной смеси продолжалась в течение 16-18 часов. После инкубации смесь фильтровали через напроновый фильтр (диаметр пор 60-80 мкм) и затем центрифугировали при 600-800 об/мин. в течение 2 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок суспендировали в 0,5 М растворе сахарозы и наслаивали сверху раствор W5 (Médgyesy et al, 1980). Полученный градиент центрифугировали при 200 об/мин. в течение 10 мин. Флотирующие протопласты отбирали, суспендировали в растворе W5 и осаждали при центрифугировании 800 об/мин. в течение 3 мин.

Изолированные протопласты использовали в экспериментах по генетической и клеточной инженерии бобовых или же суспендировали в модифицированной среде KM 8p с конечной плотностью 2×10^4 - 3×10^5 протопласта/мл и переносили в чашку Петри и ставили в термостат при 28°C. Через 3-5 суток культивирования приступали к делению протопласты разбавляли равным объемом питательной среды С с 0,35 М маннитолом, 0,4 мг/л 2,4-Д (SIGMA) и 0,5 мг/л кинетина (SIGMA). Спустя еще две недели культивирования образующиеся микроколонии разбавляли равным объемом питательной среды С с 0,25 М маннитолом и теми же фитогормонами. После одного месяца культивирования в жидких питательных средах растительные клеточные колонии при помощи пастеровской пипетки наслаивали на пластную питательную среду С (Caboche, 1980) с 0,7% агаром (DIFCO) и варьирующими концентрациями различных фитогормонов для поддержания клеточного роста, образования зеленящих на свету колоний и регенерации растений.

Электрорадия протопластов

Электрорадию протопластов экзогенными плазмидными ДНК осуществляли по модифицированной нами методике, разработанной Potrykus et al. (1985). После месяца культивирования образовавшиеся клеточные колонии пастеровской пипеткой наслаивали на питательную среду С, содержащую 1 мг/л ВАП, 0,5 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л зеатина и 100 мг/л канамицинсульфата. Спустя 3-4 недели культивирования зеленящиеся колонии отбирали и переносили на свежую питательную среду того же состава, но с 50 мг/л канамицинсульфата.

Бактерии и плазмиды

Agrobacterium tumefaciens включает плазмиду pAC323, которая содержит мутантный ген *Arabidopsis* ANAS/ALS (Acetohydroxy acid synthase/acetolactate synthase), клонированный в pBin19 (Sathasivan et al., 1990). Эта плазида представляет 5,5 kb хба I фрагмент, содержащий ген *Arabidopsis* ANAS с мутацией в аминокислоте # 653. Измененный ANAS фермент определяет селективную резистентность к имидазолному классу гербицидов. Вместе с этим конструкция также сохраняет NPT II ген под промотором для селекции канамицином.

A. tumefaciens, штамм GV3101, несет плазмиду pGV2206 (Leemans et al., 1981), производную октопиновой плазмиды TiBBS3, у которой гены синтеза ауксинов замещены бактериальным геном устойчивости к канамицинусульфату с сохранением нормальных функций других генов T-ДНК, в том числе и гена биосинтеза цитокининов.

A. rhizogenes содержит плазмиду pRiA4, перенос которой в растительные клетки определяет фенотип "бородатого корня".

Escherichia coli, штамм K 2013, несет pGA472.

Все бактериальные штаммы выращивали на среде LB с добавлением 20 мг/л канамицинусульфата (КУРГАНСКИЙ ЗАВОД МЕДПРЕПАРАТОВ, РОССИЯ).

Выделение плазмид осуществляли по методу, изложенному Maniatis et al. (1982).

Генетическую трансформацию у голубиногороха, опосредованную *Agrobacterium tumefaciens*, проводили следующим образом. Кусочки стеблей и листьев длиной 0,4-0,6 см суспендировали в жидкой питательной среде С, МБ, содержащей разные концентрации 2,4-Д, НУК, кинетина или БАП, и добавляли к ним ночную культуру *A. tumefaciens*. Подобным образом различные эксплантаты погружали в ночную культуру *A. tumefaciens*, быстро высушивали на фильтре и кокультивировали в жидкой среде с различными концентрациями 2,4-Д, НУК, кинетина, БАП, а также на безгормональной среде. Совместное культивирование продолжалось в течение 48 часов при постоянном перемешивании. Затем кусочки растительных тканей извлекали из среды, высушивали стерильной фильтровальной бумагой и раскладывали на плотную питательную среду С, МБ с добавлением 300 мг/л карбенициллина (ПО "МОСМЕДПРЕПАРАТЫ", РОССИЯ), 200 мг/л цефотаксима (CALBIOSHEM) и различных концентраций 2,4-Д, НУК, кинетина, БАП или без фитогормонов. Спустя две недели культивирования растительные ткани и образующиеся клеточные линии переносили на питательную среду

того же состава с 200 мг/л карбенициллина и 200 мг/л цефотаксима. В случае использования агробактерий, несущих ген устойчивости к канамицинусульфату, в эту питательную среду добавляли также 100 мг/л канамицинусульфата. Через две недели культивирования клеточные ткани переносили на свежую питательную среду, содержащую 100 мг/л карбенициллина и 100 мг/л цефотаксима. Образующиеся на этой питательной среде эмбриониды переносили на свежую среду того же состава. В случае использования агробактерий, несущих ген устойчивости к канамицинусульфату, отобранные клеточные линии пассировали на питательной среде MS с 50 мг/л канамицинусульфата, 1,0 мг/л 2,4 Д, 0,5 мг/л НУК и 1,0 мг/л БАП.

Слияние протопластов проводили по методу, предложенному Negutiu et al. (1986) для слияния мезофильных протопластов. Предварительное облучение протопластов *Nicotiana tabacum* проводили на установке "Исследователь", используя в качестве облучателя ^{60}Co с удельной активностью 22 рентген/сек.

Отбор асимметричных соматических гибридов проводили на питательной среде С, содержащей 50 мг/л канамицинусульфата в качестве селективного агента, а также 0,5 мг/л кинетина, 1,5 мг/л БАП, 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л аденинусульфата.

Растительные ДНК выделяли по методу, предложенному Dellaporta et al. (1983).

Гидролиз аликвот растительных ДНК проводили рестриктазами, (НПО "ФЕРМЕНТ", г. Вильнюс, Литва) в буферах и условиях, рекомендованных изготовителем. Электрофорез в агарозных гелях проводили стандартным методом (Maniatis et al., 1982).

ДНК-ДНК гибридизацию по Саузерну проводили по методу, описанному в методическом руководстве фирмы AMERSHAM.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Регенерация многочисленных растений и изолированных сегментов семян и декантированных проростков.

Так как регенерация растений *in vitro* необходима для использования техники клеточной и генетической инженерии, были проведены эксперименты, чтобы определить составы питательных сред для инициации и пролиферации каллуса и регенерации растений голубиноного гороха. Различные эксплантаты, такие как листья, стебель, гипокотиль и семена культивировали на твердой среде MS и B5 с рядом комбинаций ростовых регуляторов. Среди них ауксин 2,4-Д был более эффек-

тивен, чем НУК, в то время как НУК оказывал очень слабое действие при индуцировании каллусообразования в комбинации с БАП или кинетином. Хотя комбинации 2,4-Д с БАП или кинетином индуцировали раннее каллусообразование, каллусы быстро темнели во время дальнейшего культивирования. Комбинации НУК (1,0 мг/л - 2,0 мг/л) с БАП (0,5 мг/л) индуцировали каллусообразование в течение 7-10 дней, и каллусы сохраняли жизнеспособность при дальнейшем культивировании по крайней мере 4-6 месяцев. Комбинации 2,4-Д с кинетином были худшими для индукции каллусообразования, так же как и для последующего поддержания (сохранения) каллусов. Подобным образом комбинации НУК с кинетином оказались неподходящими для этих целей. Детальное изучение листьев семядолей и изолированных сегментов семядолей было предпринято, чтобы обнаружить возможность регенерации растений. Поскольку каллусообразование и рост каллусов из всех типов эксплантатов происходил лучше на MS среде, чем на B5, первая была выбрана для дальнейших исследований.

Регенерация растений из изолированных сегментов семядолей.

На среде MS с добавлением БАП проксимальные сегменты семядолей, полученные при поперечном отсечении семядольных листьев, продуцировали органогенный каллус, на котором дедифференцировались примордии проростков в течение 3-4 недель культивирования. На среде MS с добавлением 1,0 мг/л БАП вначале происходило каллусообразование, за которым следовала регенерация проростков. Проростки, регенерировавшие из органогенного каллуса, не образовывали корней, несмотря на длительное культивирование. Концентрации БАП ниже чем 1,0 мг/л индуцировали несколько проростков только из центральной части каллуса, тогда как периферическая часть каллуса оставалась неорганогенной. В течение первых 3-4 недель культивирования были получены проростки 1-1,5 см, после чего дифференцирующиеся каллусы переносили на свежую культуральную среду с тем же самым гормональным составом. В течение последующих 3-4 недель культивирования полученные проростки достигали размера до 5 см. Таким образом, в течение одного периода (7-8 недель) при использовании предложенной методики из проксимальных сегментов семядолей можно получить многочисленные здоровые проростки.

Снижение концентрации БАП ниже 0,5 мг/л приводило к плохому каллусообразованию и, наоборот, при увеличении концентрации БАП (более 1,0 мг/л) имело место обильное каллусообразование. В дальнейшем эти каллусы были неспособными к органогенезу. Другие регуляторы роста, такие как кинетин, аденин сульфат и аденин были не-

эффективными как для инициации органогенного каллуса, так и для регенерации растений. Дистальные сегменты семядолей не проявляли признаков морфогенеза. При продольном рассечении семядольного листа, регенерационная способность сегментов уменьшалась, так как проксимально локализованная регенеративная часть семядольной ткани отсекалась. Частота и процент регенерации варьировали в зависимости от возраста донорного семядольного листа. В таблице I суммированы эти результаты.

Таблица I. Влияние возраста донорных семядолей на регенерацию инокулированных сегментов семядолей голубинового гороха на среде MS с 1,0 мг/л БАП

Количество дней после высева семян для получения семядольных эксплантатов (дни)	Процент регенерации + среднее отклонение (кол-во побегов на 40 эксплантатов)	Продолжительность культивирования (дни)	Среднее число побегов
1	10 + 5 (4/40)	60	2
2	60 + 5 (24/40)	60	5
3	50 + 5 (20/40)	60	4
4-5	5 (2/40)	60	1
6-7	0	60	0

Регенерация растений из декапитированных проростков

Через несколько дней после посева семян, проросшие побеги из проростков отсекали у основания узла и эти декапитированные проростки культивировали на твердой среде MS с различными концентрациями различных регуляторов роста, таких как БАП, кинетин, аденин-сульфат, аденин. На среде с добавлением 0,5 мг/л БАП происходил обильный прямой органогенез побегов из узловой части декапитированных проростков. Через 2-3 недели культивирования на регенерационной среде были получены побеги размером 3-4 см. Затем вся регенерирующая масса переносилась на ту же среду без фитогормонов, но с добавлением 10-15 мл жидкой безгормональной среды. Это облегчало рост периферических побегов, которые в противном случае погибали. В итоге в течение 3-4 недель культивирования были получены многочисленные побеги длиной 5-6 см.

На среде, содержащей кинетин, нам удалось получить всего 1-2 побега, способных формировать корни. Побеги не были регенерированы

на среде с добавлением аденинсульфата и аденина. Значительные различия в регенерации проростков были обнаружены при декапировании семян через различные сроки после высева семян. Эти данные суммированы в Таблице II.

Таблица II. Влияние возраста донорных проростков на регенерацию декапированных семян голубинного гороха на среде MS с 0,5 мг/л БАП

День декапирования после высева семян	Процент регенерации + среднее отклонение (кол-во побегов на 50 эксплантатах)	Время культивирования (дни)	Среднее число побегов
3	50+2 (25/50)	20	4
4-5	70+2 (35/50)	20	6
8-10	50+2 (25/50)	20	2

Формирование корней из побегов

Отдельные побеги, полученные на регенерационной среде, изолировали и высаживали на твердую среду MS с добавлением 0.5 мг/л НУК для корнеобразования. Отдельные побеги, регенерировавшие из декапированных проростков формировали корни на безгормональной среде MS, содержащей 0,4% агара.

Фенотип регенерировавших растений

В итоге нами были получено двадцать полностью сформированных растений-регенерантов (15 регенерировало из декапированных проростков и 5 - из изолированных сегментов семядолей). Заметного различия в морфологии между контрольными растениями и растениями, регенерировавшими из декапированных проростков, не отмечено. Однако для растений, регенерировавших из изолированных семядолей, такие различия обнаружены. Отмечены следующие отличия:

а - образование пучков утолщенных побегов;

в - формирование тонких и длинных побегов, несущих на верхушке только одну спираль маленьких листьев.

Из пяти растений, полученных из изолированных сегментов семядолей, два были ненормально высокими с тонким стеблем и особым расположением листьев. Тонкие бесчерешковые листья развивались на вершине побега в виде спирали.

О регенерации растений из экплантатов семядолей, семядольных узлов и проростков бобовых часто сообщалось. При использовании этих экплантатов регенерация растений *in vitro* была получена у видов *Vigna* (Gulati and Jaiwal, 1990; Mathews and Rao, 1984; Gill

et al., 1987; Mathews, 1987), *Glycine* (Cheng et al., 1980), *Phaseolus* (Malik and Saxena) и *Cajanus* (Mehta and Mohan Ram, 1980; Kumar et al., 1983, 1984). Wright et al. (1987) и Rubluo and Kartha (1985) предполагают, что только в случае использования специфических эксплантатов у зерно-бобовых культур, может быть достигнут успех в регенерации растений. Так, Mehta and Mohan Ram (1980), культивируя целые интактные семена на средах с фитогормонами, получали из каждого семени многочисленные растения-регенеранты. В отличие от них в настоящем исследовании из семян удаляли зародыши. В культуре изолированных сегментов семядолей было обнаружено, что проксимальная часть семядолей в отличие от дистальной способна дифференцироваться. Многочисленные побеги регенерировали из этих сегментов на MS среде с добавлением БАВ в относительно низких концентрациях. Одновременно с каллусообразованием происходила дифференциация примордиев проростков. Вторичные примордии побегов развивались как из прилегающего каллуса, так и из уже образовавшихся примордиев в течение культивирования. Kumar et al (1983) сообщали о регенерации растений из изолированных семядолей, но не уточняли какие именно части семядолей способны к морфогенезу. Мы обнаружили, что только проксимальные сегменты изолированных семядолей, прилегающие к эмбриональной оси и району угла, сохраняют способность к регенерации растений.

Возраст, размер и ориентация эксплантата имеют большое значение для регенерации побегов у бобовых (Kameya and Widholm, 1981; Wright et al., 1987; Gulati and Jaiwal, 1990). Сокращение частоты регенерации голубинового гороха, связанное с возрастом донорного проростка, превышающим 3 дня, сходно с тем, что обнаружено у других видов зерно-бобовых культур (Gulati and Jaiwal, 1990). Способность к морфогенезу проксимальных сегментов семядолей *Cajanus cajan* также уменьшается с возрастом. Сходным образом половинки семядолей, полученные в результате продольного разреза, демонстрируют более низкую частоту регенерации растений, так как в этом случае органогенная ткань проксимальной части семядолей рассекается.

Регенерация многочисленных растений у голубинового гороха имеет большое практическое значение для индуцирования variability. Поскольку каллусная ткань является источником генетического разнообразия, регенерация растений из такой ткани может способствовать получению исходного ценного материала для генетического улучшения этой зерно-бобовой культуры. Идентификация и характеристика определенных эксплантатов, способных к морфогенезу, делает возможным

посредством генетической трансформации осуществлять прямую и непрямую передачу генов этому виду растений.

2. Культивирование протопластов голубиного гороха.

Выделение и культивирование мезофильных и каллусных протопластов.

До настоящего времени нам неизвестны публикации о выделении и культивировании протопластов голубиного гороха. Из растений, выращенных в асептических условиях, собирали листья различного возраста и использовали для изоляции мезофильных протопластов. Различные эксплантаты из этих же растений были дедифференцированы на твердой среде MS, содержащей БАП и НУК или 2,4-Д. Образующиеся рыхлые каллусы использовали для изоляции протопластов.

Максимальный выход протопластов ($2-2.5 \times 10^4$ протопластов из 1 г листьев) был получен из молодых листьев 20-дневного возраста. Кусочки листьев подвергали плазмолизу в 0.4M маннитол, 0,1% (w/v) MES и инкубировали в 1.3% (w/v) ферментном растворе в течение 15 часов при 28°C в темноте. Рыхлые каллусы 8-10-дневного возраста, полученные на среде MS с добавлением 2.0 мг/л НУК, плазмолизировали в 0.4M маннитол и инкубировали смесью ферментов в течение 15 часов в темноте при t 28°C. Средний выход протопластов составил 1×10^4 протопластов на 1 г каллуса.

При использовании различных осмотиков, таких как глюкоза (0.6M), маннитол (0.4M и 0.6M) и W5 солевой раствор, для плазмолиза ткани мезофилла и каллуса, 0.4M маннитол был определен как наиболее подходящий. Листья разрезали на кусочки размером 1-5 мм, а каллусы мацерировали растиранием; затем их подвергали плазмолизу в осмотическом растворе в течение 1 часа и добавляли в ферментную смесь. 15-17 часов инкубации были найдены оптимальными для выделения мезофильных протопластов; их выход был значительно ниже при инкубации, превышающей 17 часов. Стационарная инкубация была наиболее приемлемой, так как при постоянном перемешивании тканей в ферментном растворе выход жизнеспособных протопластов значительно снижался.

Среда Вр (Као & Michuluk, 1975) была модифицирована Кучуком (1986) и протопласты 5 видов бобовых успешно культивировали. Модифицированная Као и Michuluk среда с добавлением 0.4 мг/л 2,4-Д, 1.0 мг/л НУК, 0.5 мг/л БАП и 0.5 мг/л Кин была найдена как оптимальная для индуцирования делений как мезофильных, так и каллусных протопластов при плотности культуры 2×10^4 - 3.5×10^4 протопластов/мл культуральной среды.

Первое деление протопластов происходило через 72 часа и в течение 9-10 дней были получены группы из 20-30 клеток. Дальнейшее культивирование клеточных групп (кластеров) проводилось при разбавлении в 2 раза. Первое - на стадии клеточных кластеров - равным объемом Sabosche среды с 0.4 мг/л 2,4-Д, 0.5 мг/л Кин и 0.35М маннитола. Наслоение этих протоколоний на агарсодержащую среду с 0.25 М маннитолом производилось с 20-30% успехом в получении каллусов из клеточных линий. Второе растворение культуры равным количеством той же среды, но содержащей 0.25М приводило к образованию каллусов 0.5-1.0 мм диаметра спустя 2 недели. На этой стадии более чем 80% протокаллусов были способны в дальнейшем формировать каллус при переносе на агаризованную среду с 0.1М маннитола. Дальнейшее жидкое культивирование давало начало колониям 1.5-2.0 мм диаметра, которые позднее могли быть перенесены на твердую Sabosche среду без осмотика.

Культивирование каллусов на свету в жидкой Sabosche среде с 1.0мг/л ВАП, 0.5мг/л Кин, 40,0мг/л АднС и 0.25М маннитола приводило к формированию зеленых каллусных колоний в течение 10-15 дней. Разнообразные регуляторы роста растений или одиночные или в комбинации оказывались неспособными индуцировать органогенеа в жидкой или агаризованной среде. Протопласты, изолированные из листьев, так же как и из каллусов давали сходные результаты. Результаты формирования каллусов суммированы в табл. III. Для немногих видов зерновых бобовых, таких как *Glycine*, *Pisum sativum*, *Vigna*, *Phaseolus* и *Cicer* были определены экспериментальные протоколы для изоляции протопластов и их культивирования.

Таблица III Формирование каллусов из протопластов на Sabosche среде

Состав регуляторов роста	Концентрация регуляторов роста в мг/л	Формирование каллуса
Кин; ВАП; НУК	0.5-2.0; 0.5-1.0; 0.1-0.5	++
Кин; ВАП; НУК; 2,4-Д	0.5-2.0; 0.5-2.0; 0.1-0.5; 0.1-0.5	++
Кин; ВАП; Адн С;	0.5-2.0; 0.5-2.0; 40.0	+++
Кин; ВАП; Адн С; ГА ₃	0.5-4.0; 0.5; 40.0; 0.2-0.5	+
Кин; ВАП; Адн С; 2,4-Д	0.5; 1.0-5.0; 40.0; 0.1-0.2	+++
Кин; ВАП; Адн с; Зеа;	0.5-1.5; 0.5-1.5; 40.0; 0.2-0.5;	+++
ГА ₃	0.2-0.5	
Кин; Адн С; Зеа; ГА ₃	0.5-4.0; 40.0; 0.2-0.5; 0.2-0.5	+

Обозначения:

- + - слабое каллусообразование, быстрое потемнение каллуса.
- ++ - умеренное каллусообразование, каллус остается зеленым в течение 2-3 недель.
- +++ - Хорошее каллусообразование каллус остается зеленым в течение 4-6 недель.

Большой выход мезофильных протопластов был получен на всех трех сортах голубиноного гороха ICPL-87 *Kardula* и *Kayagada local* (*Rahada*). Полностью раскрытые молодые листья были наиболее подходящим источником для изоляции протопластов, чем зрелые листья, которые становились ксерофитными и плохо растворялись смесью ферментов. Большая часть каллусов голубиноного гороха быстро темнела при высоких концентрациях ауксинов и каллусы становились непригодными для дальнейшего использования. Однако при комбинации 0.5 мг/л 2,4-Д и 1.0 мг/л НУК с 0.5 мг/л БАП формировались рыхлые каллусы. Но эти каллусы сохранялись не более, чем 4 недели, несмотря на частое пассирование.

Жидкое культивирование протопластов было очень эффективным и значительно сокращало время получения каллуса. Заключение клеточных кластеров в агаризованную среду с осмотиком требовало около 4 месяцев для того, чтобы получить каллусы равного размера; такие же каллусы можно получить в течение 1 месяца при культивировании в такой же жидкой среде.

Ряд сред, содержащих MS, B5 и Sabose основные соли с различными гормональными добавками были использованы для культивирования протоколоний, колоний, так же как протопластов, производящих каллус. Трудности при получении регенерации побегов из протопластов выглядят очень сходными с теми, которые возникают при культивировании тканей голубиноного гороха.

3. Генетическая трансформация голубиноного гороха.

Прямая передача генов, электропорация протопластов.

Протопласты мезофила листа были электропорированы с экзогенной плазмидной ДНК, имеющей растительные селективные маркерные гены. Плазмидная ДНК, содержащая химерный канамицин резистентный ген была почти пригодна. Протопласты в концентрациях 5×10^6 в электропоративном буфере были электропорированы в поле различного напряжения с различной продолжительностью импульсов, так что 50-60% от общего числа протопластов оставались живыми после электропорации. Комбинированное действие ПЭГа и электрического импульса использовались для проникновения экзогенной ДНК.

Условия электропорации сильно влияли на деление протопластов. Отмывка обработанных протопластов в 0.5M солевом растворе увеличивала жизнеспособность и делимость протопластов. Когда протопласты формировали протоколонии, последние наносились на агаризованную среду с 0.2M осмотиком (маннитол), 1.0 мг/л БАП, 0.5 мг/л Кин, 40.0 мг/л Аднс и 100 мг/л канамицинсульфата.

Около 30 зеленых колоний были селективированы и культивировались в дальнейшем в той же среде с 50 мг/л канамицинсульфата и большие каллусные массы были получены. Эти каллусы сохраняли (поддерживали) на агаросодержащей среде с 1.0 мг/л ВАП, 1.0 мг/л 2,4-Д, 0.5 мг/л канамицинсульфата.

Общая ДНК из каллусов была гибридизована с NPT II пробой ДНК по Саузерну и локализация фрагмента была определена на ауторадиограмме.

Это первое сообщение об успешной передаче и интеграции чужеродной ДНК в геном голубиногорского гороха через электропорацию протопластов. Результаты показывают возможность прямой передачи гена в клетки этого растения.

Непрямая передача генов с помощью *Agrobacterium*

Не было раньше никаких сообщений об исследовании совместности хояэин-патоген между *Agrobacterium* и голубиным горохом. Для того чтобы установить это стебли асептически выращенных растений инъецировали (микроинъекции) вирулентными линиями *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Различные эксплантаты, такие как стебель, гипокотиль, семядоли и листья инфицировали и культивировали как описано раньше. Коричневые галлы появлялись на стебле в местах укола, но корневые волоски не формировались. На безгормональной агаризованной MS среде эксплантаты, культивированные с *A. tumefaciens* продуцировали каллусы в участках инфицирования и морфология каллусов была очень сходна с опухолью, индуцированной на стебле. Но ни каллусообразования, ни формирования волосатых корней не происходило при использовании *A. rhizogenes*.

Регенерация с *shooter* линией *A. tumefaciens*.

Плазмиды pGV2208 индуцируют побеги формирование (Leemans et al, 1981; Smigocki and Owens, 1988). Различные эксплантаты были инфицированы и культивировались с pGV2208, как описано в разделе "Материал и методы". Каллусообразование происходило в зоне разреза и местах инфицирования. Каллусы были зелеными, гранулярными, медленно растущими и продолжали расти на среде, свободной от регуляторов роста, в отличие от контрольных эксплантатов, которые высухали на безгормональной среде. В нескольких случаях каллусы, образовавшиеся из гипокотильных сегментов, становились эмбриогенными и регенерировали побеги на безгормональной среде MS. Процесс регенерации побегов, также как их удлинение происходил очень медленно. Через 4-5 месяцев 4 побега сформировались. Проростки были карликовыми с хилыми стеблями, очень укороченными междоузлиями и малень-

кими листьями. Эти проростки переносили на безгормональную агаризованную среду, а также на ту же среду с 0.5 мг/л НУК для индукции корнеобразования. Но эти растения никогда не образовывали корней и умирали через 3-4 месяца. Каллусы, сформировавшиеся на безгормональной среде в результате культивирования с 'shooter' линией, имели свои особенности. Эти каллусы темнели во время культивирования при интенсивном освещении и после переноса их в условия низкой освещенности зеленели и начинали свежее каллусообразование.

Сауэри блот гибридизация с общей ДНК из каллусов и регенерирующими shoots с NPT II пробой ДНК фрагментом подтверждали интеграцию T-ДНК.

Генетическая трансформация голубиноного гороха посредством кокультивации семядольных сегментов и декаптитированных проростков

Установив, что опосредованная *Agrobacterium* передача гена в клетки голубиноного гороха возможна; регенеративные эксплантаты кокультивировали с различными линиями *A. tumefaciens*, несущими гены растительных селективных признаков. Регенеранты селектировали на регенерирующей среде (описано в материале и методах) с 100 мг/л канамицисульфата после совместного культивирования (кокультивирования) с *A. tumefaciens*, несущей плазмиду pAC323.

Канамицинрезистентные клеточные линии пролиферировали каллусы на различных средах с канамицином. Хорошо растущие побеги формировали корни на безгормональной жидкой среде MS и впоследствии их переносили в ту же самую среду с 50 мг/л канамицисульфата. Канамицинрезистентные растения содержали в культуральной комнате. Сегменты из этих растений изолировали и помещали на MS среду с 1.0 мг/л НУК и 0.5 мг/л БАП с 50 мг/л канамицисульфата. Эксплантаты дедифференцировались в каллус и формировали роскошную каллусовую массу на канамицинсодержащей среде. Сауэри блот гибридизация общей ДНК из этих растений, также как каллусы с NPT II пробой ДНК подтвердили их природу трансформации.

Об использовании 'shooter strain' (pGV2206) в регенерации растений из "непокорных" видов сообщалось (Kuchuk, 1990). В этом случае, хотя перенос цитокинин биосинтезирующего гена и его экспрессия были подтверждены анализами и наблюдениями, его роль в дифференциации побега является противоречивой. Когда использовали молодые гипокотильные эксплантаты, регенерация растений на безгормональной среде происходила, но с другими типами эксплантатов формировался только каллус. Среди факторов совместного культивирования: погружение эксплантатов в свежерастущую бактериальную культу-

ру, затем культивирование их на агарсодержащей среде было более подходящим, чем совместное культивирование в жидкой среде. Так как в последнем случае эксплантаты темнели при последующем культивировании.

Перенос гена агробактерией посредством совместного культивирования с плазмидой pAS323 был достаточно успешным, и около 5 трансформированных растений было получено. В этом случае также совместное культивирование на агаризованной среде оказалось более подходящим, чем на жидкой среде. В некоторых случаях проводилось прекультивирование эксплантатов в течение 1-2 дней перед инфицированием бактериальным штаммом, однако никаких сколько-нибудь заметных и важных различий не было отмечено.

3. Асимметричная пересексуальная гибридизация между голубиным горохом и табаком.

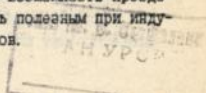
Формирование соматических гибридных клеточных линий из продуктов слияния мезофильных протопластов голубинового гороха и облученных канамицинрезистентных протопластов табака

Протопласты мезофилла листа голубинового гороха можно было индуцировать к слиянию с канамицинрезистентными протопластами мезофилла *N. tabacum*, инактивированными облучением (250Gy) (20мин), как описано в материале и методах. Слияние протопластов и формирование гетерокарионов наблюдали в инвертированном микроскопе. Продукты слияния культивировали в жидкой среде KV8p в темноте, как описано для культуры протопластов. Спустя один месяц протоколонии развивались и всю культуру заключали в агаризованную Saboshe среду с 0.1 M маннитола, 1.5 мг/л БАП, 0.5 мг/л Кин, 0.5 мг/л Ада, 0.5 мг/л 2.4-Д и 50 мг/л канамицинсульфата. Предполагаемый асимметричные гибридные каллусы были получены на MS среде с 3.0 мг/л БАП, 1.0 мг/л Зеа, 0.5 мг/л НУК и 50 мг/л канамицинсульфата. Эти каллусы использовали для установления их гибридной природы.

ПРЕДЛАГАЕМЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Для использования в работе по получению новых форм и сортов для научных организаций и других ведомств, занимающихся селекцией эти культур, предлагаются высокоэффективные способы культивирования протопластов, генетической трансформации и соматической гибридизации.

2. Полученное растение со встроенными генами Т-ДНК мутанта "shooty" *Agrobacterium tumefaciens* показывает возможность преодоления непокорной природы, которое могло бы быть полезным при индуцировании регенерации на культивируемых каллусов.



3. Предлагается получать асимметричные соматические гибриды между *Cajanus cajan* и другими видами, а также его дикими родственниками, сохраняющими интактным свой геном и определенные гены, контролирующие важные агрономические признаки.

ВЫВОДЫ

1. Впервые разработаны и стандартизованы экспериментальные протоколы для регенерации растений *in vitro* голубинового гороха *Cajanus cajan*.

2. Проведена идентификация экплантатов, способных к морфогенезу. Обнаружено, что только проксимальная часть семядолей и декапитированные проростки обладают достаточно высоким регенерационным потенциалом.

3. Впервые предложены эффективные методы выделения и культивирования мезофильных и каллусных протопластов голубинового гороха.

4. Впервые отработаны методики генетической трансформации *Cajanus cajan* методом кокультивирования с *Agrobacterium tumefaciens* и прямого переноса генов с помощью электропорации протопластов.

5. Методом кокультивирования семядолей и декапитированных проростков с *Agrobacterium tumefaciens* получены трансгенные клеточные линии и растения голубинового гороха. С помощью ДНК-ДНК гибридизации показана стабильная интеграция генов в геном растительных клеток.

6. Показана возможность асимметричного слияния протопластов *Cajanus cajan* и *Nicotiana tabacum*. Продукты слияния были способными к делению и образованию колоний на среде, содержащей канамицин.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

(1) Sarangi B. K., M. Mohanty and S. N. Patnaik, Callus response and plantlet regeneration in *Cajanus cajan*, *Alysicarpus cajanifolia* and their F1 hybrids. Plant Science Research (Journal of the Orissa Botanical Society) (1988) 10: 7-16.

(2) Sarangi B. K., *In vitro* morphogenetic potential of *Cajanus cajan* for the induction of somaclonal variation. Abstracts; XI International Symposium, Embryology and Seed Reproduction. July 3-7, 1990, Leningrad, USSR. pp-143.

(3) Sarangi B. K. and Y. Y. Gleba, Direct multiple regeneration in *Cajanus cajan* (L.) Millsp.. International Symposium on Plant Biotechnology and its contribution to the improvement. Geneva,

Switzerland, April 19-20, 1991. Acta Horticulturae (1991) 289: 149-150.

(4) Sarangi B.K., N.V. Kuchuk, Y.Y. Gleba. Electroporation of mesophyll protoplasts and production of transgenic callus in *Cajanus cajan*. Abstracts; 8th International protoplast symposium, June 18-20, 1991, Uppsala, Sweden. Physiologia Plantarum (1991) 82 (1): A 33.

(5) Sarangi B.k., N.V. Kuchuk, Y.Y. Gleba. *Agrobacterium* mediated transformation of pigeonpea, *Cajanus cajan* (L.) Millsp. Abstracts; First symposium 'Trends in Plant Biotechnology', November 20-22, 1991, Moscow, USSR, pp-144.

(6) Sarangi B.K., N.V. Kuchuk and Yuri Y. Gleba. Isolation and culture of protoplasts of pigeonpea. Plant Cell Rep., (1992)11: 462-485.

Blazas

Зам. 295 Формат 60x84/16 Обл. - вид. арк. I, 06

Підписано до друку 20.II.1992 р. Тираж 100.

Поліграфічна дільниця Інституту теоретичної фізики АН України

469786

AV26.438

AV 26.438